ChinaXiv合作期刊

基础研究

Rho激酶和自噬在法舒地尔抗心肌缺血/再灌注损伤中的作用

叶红伟[1],方婷婷[1],谷小雨[1],王 娅[1],朱广宇[2],于 影[1],高 琴[1]
蚌埠医学院[1]生理学教研室,[2]生物科学系,安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探讨自噬在法舒地尔(Fasudil)抑制Rho激酶心肌保护中的变化,并分析其作用及可能机制。**方法** 离体大鼠心脏Langendorff装置灌流,结扎冠状动脉左前降支30 min模拟局部心肌缺血,松开结扎线恢复灌流120 min复制心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型。实验分3组:I/R组、法舒地尔(Fasudil)组、和Fasudil+自噬抑制剂渥曼青霉素(Wort)组。连续记录左心室动力学变化,收集再灌注5、10 min冠脉流出液测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量;RT-PCR检测自噬相关基因Atg5、Beclin1和凋亡相关基因Bax、Bcl-2 mRNA表达的变化,Western blotting检测caspase 3的表达变化。**结果** 与I/R组比,Fasudil使左心室发展压、左心室内压最大上升及下降速率、左心室做功明显得到改善,降低复灌期冠脉流出液中LDH的释放,Atg5、Beclin1 mRNA表达增加,Bcl-2/Bax mRNA升高,caspase 3蛋白表达降低。自噬抑制剂Wort减弱了法舒地尔的保护作用,抑制了心室动力学指标的恢复,LDH释放增多,Atg5和Beclin1 mRNA表达降低,Bcl-2/Bax降低,caspase 3蛋白表达升高。**结论** 抑制Rho激酶心肌保护作用中诱导了自噬的发生,且自噬起到保护心肌的作用,可能与减少细胞凋亡有关。

关键词:心脏;缺血/再灌注损伤;自噬;法舒地尔;渥曼青霉素

Role of autophagy in fasudil-induced Rho kinase inhibition for protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

YE Hongwei[1], FANG Tingting[1], GU Xiaoyu[1], WANG Ya[1], ZHU Guangyu[2], YU Ying[1], GAO Qin[1]
[1]Department of Physiology, [2]Department of Biological Sciences, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the changes of autophagy in ischemic myocardium of rats treated with fasudil for inhibiting Rho kinase. **Methods** The hearts isolated from male Sprague-Dawley rats were subjected to 30 min of occlusion of the left anterior descending artery followed by 120 min of reperfusion with or without treatment with fasudil or fasudil+Wort. The left ventricular hemodynamics were continuously recorded, and the coronary effluent was collected during the reperfusion to determine lactate dehydrogenase (LDH) levels. The mRNA expressions of autophagy-related genes *Atg5* and *Beclin1* and apoptosis-related genes bax and bcl-2 were detected by RT-PCR, and the protein expression of caspase-3 was detected by Western blotting. **Results** Compared with I/R group, fasudil significantly improved the left ventricular developed pressure, maximal rise/fall rate of left ventricular pressure and rate pressure product, reduced LDH release during reperfusion, increased *Atg5* and *Beclin1* mRNA expression and the ratio of Bcl-2/Bax, and lowered caspase 3 protein expression. The autophagy inhibitor Wort significantly attenuated the effect of fasudil in the rat hearts. **Conclusion** Fasudil treatment for inhibiting Rho kinase promoted autophagy in *ex vivo* rat heart to protect against myocardial ischima-reperfusion injury possibly by reducing apoptosis of the cardiac myocytes.

Key words: hearts; ischemia/reperfusion injury; autophagy; fasudil; wortmannin

心血管疾病威胁着人类的生命健康,再灌注疗法改善了心脏功能,取得了很好的疗效,也引起了新问题——缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。研究I/R损伤的相关机制,有助于防治临床心肌损伤的发生,Rho激酶和自噬都参与了心肌I/R损伤。Rho激酶是一类丝-苏氨酸蛋白家族,抑制Rho激酶可以起到抗心肌缺血/再灌注损伤作用[1-2]。自噬是现阶段的各种疾病机制的研究热点,早期认为自噬是进化过程中高度保守的、在溶酶体内降解细胞质成分的正常生理过程,除维持生理机体稳态功能外,近年来相继报道自噬功能的失调还与衰老、神经退行性病变、心血管疾病等相关[3-4],自噬在心肌I/R损伤中的作用存在争议,一方面认为自噬增强可能导致细胞死亡,加重心肌I/R损伤[5],另一方面却认为自噬在I/R损伤中起着有益的作用[6-7]。因此,尽管多种研究表明自噬参与心肌I/R损伤,但自噬的作用仍无定论。有研究表明Rho激酶与自噬之间存在一

收稿日期:2016-09-14
基金项目:安徽省自然科学基金(1508085MH169,1508085QH150);蚌埠医学院校级科研项目(byky1311);安徽省大学生创新创业训练项目(201510367019)
作者简介:叶红伟,硕士,讲师,E-mail: yehongwei223@163.com
通信作者:高 琴,博士,教授,电话:0552-3175271,E-mail: bbmcgq@126.com

chinaXiv:201712.00232v1

ChinaXiv合作期刊

定的联系[8]，但在法舒地尔抑制Rho激酶对抗心肌I/R损伤中，自噬如何发生，发挥何种作用尚未见报道，尽早明确自噬的作用及可能机制可为减轻心肌I/R损伤提供治疗新途径。本研究通过复制离体大鼠心肌I/R损伤模型，观察抑制Rho激酶心肌保护作用的同时，检测自噬相关基因Atg5、Beclin1 mRNA表达的变化，以明确自噬是否参与抑制Rho激酶的心肌保护；应用自噬抑制剂进一步探讨自噬在法舒地尔心肌保护中的作用，并观察凋亡相关因子的改变，分析自噬与凋亡的发生在心肌保护作用中的关联。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

健康Sprague-Dawley（SD）大鼠，雄性，SPF级，体质量220~250 g，共24只，由蚌埠医学院实验动物中心提供。川威（盐酸法舒地尔注射液），Rho激酶抑制剂，购自天津红日药业股份有限公司。自噬抑制剂渥曼青霉素（Wortmannin, Wort）购自于Sigma公司。改良Krebs-Henseleit（K-H）液成分：NaCl 118 mmol/L，KCl 4.7 mmol/L，KH_2PO_4 1.2 mmol/L，$MgSO_4$ 1.2 mmol/L，$CaCl_2$ 2.5 mmol/L，$NaHCO_3$ 25 mmol/L，Glucose 11 mmol/L，pH 7.3~7.4。Trizol总RNA提取试剂购自Invitrogen公司；逆转录试剂盒和PCR试剂盒购自Fermentas公司；引物合成于上海生工生物工程技术服务有限公司，Atg5引物：上游序列5'-AGT GGA GGC AAC AGA ACC-3'，下游序列5'-GAC ACG AAC TGG CAC ATT-3'，预计扩增产物长度205 bp；Beclin1引物：上游序列5'-GAG CCA TTT ATT GAA ACT CGC CA-3'，下游序列5'-CCT CCC CGA TCA GAG TGA A-3'，预计扩增产物长度为106 bp；Bax引物：上游序列5'-GGA TCG AGC AGA GAG GAT GG-3'，下游序列5'-TGG TGA GTG AGG CAG TGA GG-3'，预计扩增产物长度464 bp；Bcl-2引物：上游序列5'-CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG-3'，下游序列5'-GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG-3'，预计扩增产物长度228 bp；以β-actin为内参照，引物上游序列5'-CTG TAT GCC TCT GGT CGT AC-3'，下游序列5'-TGA TGT CAC GCA CGA TTT CC-3'，预计扩增产物长度214 bp。一抗小鼠抗大鼠β-actin抗体、兔抗大鼠caspase 3抗体均购自Cell Signaling Technology公司，二抗HRP标记的羊抗兔Ig G、HRP标记的羊抗小鼠Ig G均购自Affinity公司。

1.2 离体大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型制备及分组

4%水合氯醛麻醉大鼠，断头器上断头，开胸迅速取心脏置冰水停搏，Langendorff装置上行主动脉干逆行灌流。K-H液恒压（76 mmHg）灌流，以95% O_2+5% CO_2饱和，维持灌流液温度37 ℃恒温。切开左心耳将乳胶囊插入至左心室，囊内压力经特氟纶管传递至压力传感器，Medlab生物信号采集处理系统记录实验结果。待心脏稳定25 min后，进行实验干预。将大鼠随机分3组，每组8只：（1）缺血/再灌注（ischemia/reperfusion, I/R）损伤组：将大鼠冠状动脉左前降支结扎30 min复制局部心肌缺血，随之解开结扎线灌流120 min作为单纯I/R；（2）Fasudil组：同I/R组，期间（缺血前10 min至再灌注初期10 min）给予法舒地尔30 μmol/L，共灌流50 min；（3）Fasudil+Wort组：同I/R组，期间（同上）同时给予法舒地尔30 μmol/L+渥曼青霉素100 nmol/L，共灌流50 min。

1.3 左心室功能指标

向乳胶囊注水调整左心室舒张末压（left ventricular end diastolic pressure, LVEDP）维持在4~10 mmHg，Medlab生物信号采集处理系统记录左心室发展压（left ventricular developed pressure, LVDP）、LVEDP和左心室内压最大上升和下降速率（maximal rise/fall rate of left ventricular pressure, ±dp/dtmax），计算左心室做功量（rate pressure product, RPP），RPP=LVDP×HR[9]。

1.4 离体心脏冠脉流出液中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）含量测定

再灌注第5 min和第10 min收集冠脉流出液，分光光度法测定冠脉流出液中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）的含量，单位以U/L表示。

1.5 RT-PCR检测Atg5、Beclin1、Bax和Bcl-2 mRNA表达

利用Trizol总RNA提取试剂提取左心室组织总RNA，取总RNA 3 μL作模板，逆转录试剂盒合成cDNA，PCR试剂盒取1.5 μL cDNA为模板，进行扩增。扩增条件:95 ℃预变性3 min后，以（1）95 ℃ 30 s变性；（2）Atg5退火温度56 ℃ 30 s，Beclin1退火温度57 ℃ 30 s，Bax退火温度64.5 ℃ 30 s，Bcl-2退火温度61.5 ℃ 30 s，β-actin退火温度58℃ 30 s；（3）72 ℃ 35 s，循环数为30，最后一轮延伸10 min。取4 μL PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭显色。GIS凝胶图像处理系统拍摄记录，图像分析软件扫描泳带净光密度值作半定量分析，以目的基因与内参的净光密度比值（Atg5/β-actin; Beclin1/β-actin; Bcl-2/β-actin; Bax/β-actin）表示mRNA相对表达量，并计算Bcl-2/Bax比值。

1.6 Western blotting检测心肌组织caspase 3的表达

收集再灌后心肌组织，试剂盒提取蛋白，BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。配制6%~15% SDS聚丙烯酰胺凝胶，进行电泳分离蛋白，然后200 mA将蛋白转至PVDF膜上。室温下5%脱脂奶粉封闭2 h，用相应的I抗（1∶1000）4 ℃孵育膜过夜，洗涤后换HRP标记II抗室温孵育2 h。洗涤后采用化学发光试剂盒在CE Image

chinaXiv:201712.00232v1

ChinaXiv合作期刊

Quant LAS 4000 mini超灵敏化学发光成像仪显影，使用Image J的软件分析条带灰度值。

1.7 统计分析

实验数据以均数±标准差表示。各组间数据显著性检验采用单因素方差（One-way ANOVA）分析，两两比较采用q检验，P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 左心室功能改变

单纯I/R组大鼠心脏缺血与复灌期间LVDP降低，LVEDP上抬，±dp/dtmax降低，RPP降低；与单纯I/R组相比，Fasudil组LVDP和±dp/dtmax得到恢复，LVEDP降低，RPP增加；与Fasudil组相比，自噬抑制剂Wort干预后LVDP、±dp/dtmax和RPP均降低，再灌期间LVED明显升高，提示抑制自噬减弱了法舒地尔的作用（表1）。

表1 离体大鼠心脏动力学指标

Tab.1 Hemodynamic parameters of the isolated rat heart (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Parameters	Baseline	Ischemia 30 min	Reperfusion			
			30 min	60 min	90 min	120 min
LVDP (mmHg)						
I/R	91.20±18.06	63.74±8.51	45.56±5.09	41.04±3.01	37.29±3.90	34.67±3.07
Fasudil	92.81±2.72	43.88±13.17	56.28±4.89**	52.10±8.04**	50.55±9.99**	47.93±10.37**
Fasudil+Wort	85.85±4.07	47.09±7.19	49.90±7.49#	47.40±3.64#	40.09±2.69##	40.86±4.49#
LVEDP (mmHg)						
I/R	9.56±2.14	18.58±1.06	28.35±2.60	27.16±2.57	26.77±3.44	25.77±4.17
Fasudil	8.88±2.13	25.21±2.33	23.75±2.07**	23.26±4.81*	21.64±5.33*	20.27±4.92*
Fasudil+Wort	7.95±0.63	30.44±5.72	35.01±3.38**##	32.98±2.86**##	30.81±3.55##	28.91±3.87##
+dp/dtmax (mmHg/s, $\times10^3$)	-					
I/R	2.27±0.37	1.55±0.28	1.32±0.17	1.19±0.16	1.07±0.13	1.06±0.23
Fasudil	2.12±0.28	1.23±0.16	1.56±0.16**	1.44±0.20*	1.39±0.23**	1.35±0.24*
Fasudil+Wort	2.29±0.46	1.19±0.26	1.27±0.16##	1.22±0.11#	1.18±0.12#	1.05±0.11#
-dp/dtmax (mmHg/s, $\times10^3$)						
I/R	1.47±0.29	0.96±0.22	0.72±0.16	0.66±0.13	0.59±0.11	0.57±0.15
Fasudil	1.49±0.14	0.71±0.13	0.89±0.12*	0.83±0.14*	0.80±0.14**	0.77±0.13*
Fasudil+Wort	1.38±0.37	0.67±0.19	0.69±0.06#	0.66±0.05##	0.63±0.6##	0.61±0.04#
RPP(mmHg×beats, $\times10^3$)						
I/R	22.48±3.80	12.68±0.92	8.89±1.43	7.91±0.99	6.71±0.59	5.64±0.51
Fasudil	25.90±2.09	10.41±1.99	11.48±1.48*	10.74±1.53**	10.06±1.69**	8.99±1.14**
Fasudil+Wort	23.16±5.73	7.54±2.33	9.17±1.87 ##	8.56±2.01#	8.29±1.90*#	7.41±1.49**#

*P<0.05, **P<0.01 *vs* I/R group; #P<0.05, ##P<0.01 *vs* Fasudil group.

2.2 离体心脏冠脉流出液中LDH含量测定

与单纯I/R相比，Fasudil使复灌不同时间点大鼠心脏冠脉流出液中LDH释放减少；与Fasudil组相比，Fasudil+Wort组LDH释放增加（图1）。

2.3 心肌组织Atg5、Beclin1、Bcl-2和Bax mRNA的表达

单纯I/R组自噬相关基因Atg5和Beclin1和凋亡相关因子Bcl-2和Bax mRNA均有表达，提示自噬和凋亡均参与心肌I/R损伤；与单纯I/R组相比，Fasudil组Atg5和Beclin1 mRNA表达增加，抑制凋亡因子Bcl-2表达增加，Bcl-2/Bax比值增高；与Fasudil组比较，Fasudil+Wort组Atg5和Beclin1 mRNA表达减少，Bcl-2/Bax比值降低（表2，图2，图3）。

2.4 心肌组织中caspase 3蛋白表达

与单纯I/R组相比，Fasudil组caspase 3蛋白表达降

chinaXiv:201712.00232v1

ChinaXiv合作期刊

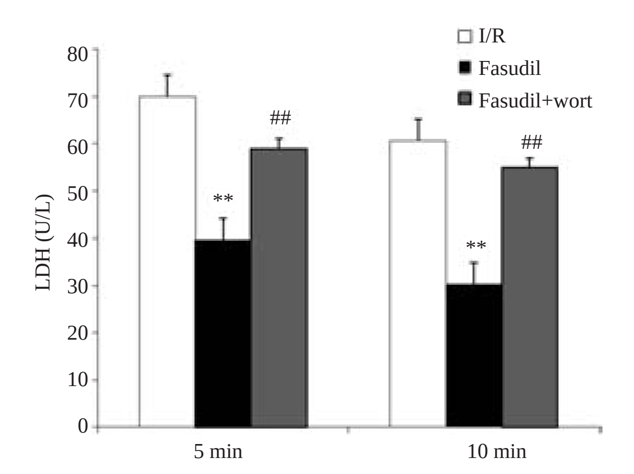


图1 心脏冠脉流出液中乳酸脱氢酶含量

Fig.1 LDH content in the coronary effluent in different groups (*n*=8, U/L, *Mean*±*SD*). ***P*<0.01 *vs* I/R group; ##*P*<0.01 *vs* Fasudil group.

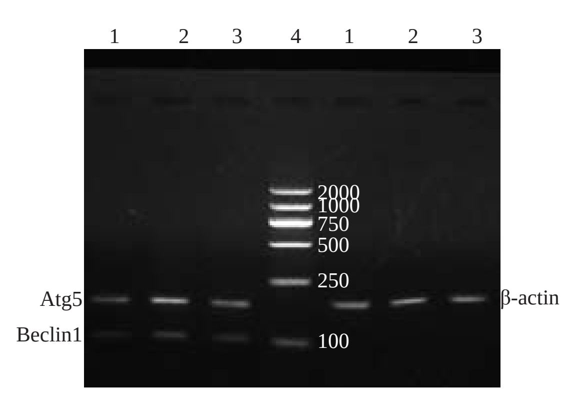


图2 各组心肌组织中Atg5和Beclin1 mRNA琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of Atg5 and Beclin1 mRNA in different groups. 1: I/R group; 2: Fasudil group; 3: Fasudil+Wort group; 4: Marker.

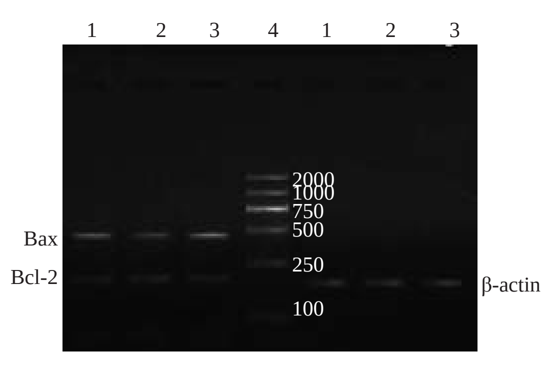


图3 各组心肌组织中Bcl-2和Bax mRNA琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in different groups. 1: I/R group; 2: Fasudil group; 3: Fasudil+Wort group; 4: Marker.

低；与Fasudil组比较，Fasudil+Wort组caspase 3蛋白表达升高(图4,表3)。

3 讨论

心血管疾病的再灌注疗法带来新的问题——缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤，钙超载、氧化应激、中性粒细胞学说等现已得到公认，但其发生机制还需进一步阐明。Rho激酶在I/R损伤中起到很重要的作用，抑制Rho激酶可以激活PI3K/Akt信号通路保护心脏[10-11]；我们前期的研究显示法舒地尔能够抑制Rho激酶信号通路发挥心肌保护作用，其机制可能与激动ALDH2、抑制细胞凋亡发生有关[12]，可见Rho激酶可能通过不同机制参与了心肌I/R损伤，其中是否有自噬的参与、自噬发挥何种作用以及相关机制未见报道，还需进一步探讨。

表2 各组心肌组织中Atg5、Beclin1、Bcl-2和Bax mRNA表达

Tab.2 Atg5, Beclin1,Bcl-2 and Bax mRNA expressions in myocardial tissue and the ratio of Bcl-2/Bax in different groups (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Group	Atg5/β-actin	Beclin1/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bcl-2/Bax
I/R	59.75±6.82	113.07±6.78	97.76±13.64	2.79±0.27	34.96±3.25
Fasudil	72.03±7.25**	146.47±13.17**	119.82±21.01*	2.32±0.54	52.26±5.09**
Fasudil+Wort	65.83±1.61*#	108.53±4.67##	108.21±17.51	2.92±0.45	37.24±5.16##

**P*<0.05, ***P*<0.01 *vs* I/R group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 *vs* Fasudil group.

本研究应用Langendorff装置复制心肌I/R损伤模型，检测大鼠心肌缺血再灌注不同时间点心肌动力学改变，LVDP、+dp/dtmax反映心肌收缩功能；LVDEP、-dp/dtmax反映心肌的舒张功能[13]。实验结果显示，与I/R组相比，Rho激酶抑制剂Fasudil组大鼠心肌再灌注期间各时间点LVDP、±dp/dtmax及RPP升高，抑制LVEDP的升高，说明Fasudil抑制Rho激酶后，心脏再灌注后收缩和舒张机能得到改善。

乳酸脱氢酶是一种糖酵解酶，早期血清中LDH的升高见于急性心肌梗塞发作后，临床上常作为诊断急性心梗的标准之一；I/R损伤时细胞膜通透性增加，LDH释放增多，因此可将冠脉流出液中LDH含量作为判断受损的指标[14]。实验中观察到Fasudil抑制Rho激酶后降低了心肌再灌注期间LDH的释放，说明Fasudil抑制

chinaXiv:201712.00232v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.00232v1

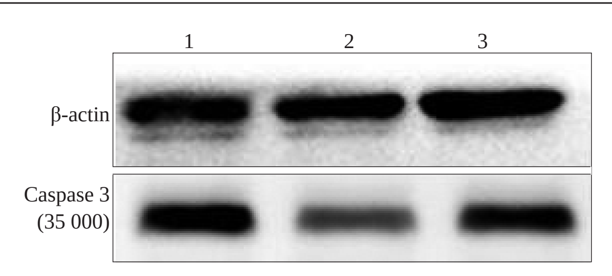


图4 各组心肌组织中caspase 3蛋白表达

Fig.4 Caspase 3 protein expression in rat myocardial tissue in different groups. 1: I/R group; 2: Fasudil group; 3: Fasudil+Wort group.

表3 各组心肌组织中caspase 3蛋白表达平均灰度值

Tab.3 Caspase 3 protein expression average grey value in rat myocardial tissue of different groups (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Group	Caspase 3/β-actin
I/R	0.85±0.08
Fasudil	0.60±0.03**
Fasudil+Wort	0.74±0.10*##

*P<0.05, **P<0.01 *vs* I/R group; ##P<0.01 *vs* Fasudil group.

Rho激酶后减轻I/R损伤。

细胞死亡分为坏死、凋亡和自噬。凋亡和自噬的均参与I/R损伤[15]。抑制Rho激酶的心肌保护作用与降低细胞凋亡相关[1]，那么自噬是否亦参与其中呢？我们检测了自噬相关基因Atg5和Beclin1 mRNA的表达。哺乳动物的自噬相关基因Beclin1是酵母自噬基因Apg6/Vps30的同源物，是自噬重要的正调节因子，常作为自噬的定量检测的重要指标[16]。Atg5是参与自噬调控的重要基因，Atg5与Atg12复合物定位于自噬体膜的表面，促进自噬体膜的伸展扩张，诱导自噬体的形成，是自噬体形成所必须的重要因素[17-18]。结果显示Fasudil组Atg5和Beclin1 mRNA表达增加，提示Fasudil抑制Rho激酶抗心肌I/R损伤作用中诱导了自噬的发生。进一步应用自噬抑制剂渥曼青霉素发现，自噬减弱的同时Fasudil的抗心肌I/R损伤作用减弱，提示Fasudil抑制Rho激酶后可能通过诱导自噬的发生发挥心肌保护作用。

I/R损伤中凋亡和自噬共同参与，且两者间存在一定联系。HL-1心肌细胞研究中发现，下调自噬相关基因Beclin1或Atg5抑制自噬发生，同时也使I/R损伤诱导的细胞凋亡增加，而过表达Beclin1增强自噬，则使细胞凋亡发生率降低[19]。肝脏的缺血预处理上调小鼠体内自噬和凋亡的关键因素之一——血红素氧合酶1，通过p38-MAPK信号通路诱导自噬，然后吞噬受损的线粒体抑制细胞凋亡，最终保护肝细胞免受I/R损伤[20]。那么抑制Rho激酶后，自噬与凋亡是何种关系呢？我们进一步检测caspase 3蛋白表达和Bcl-2和Bax mRNA的表达。Caspase 3，属于效应caspase蛋白，位于细胞凋亡有序级联反应的下游，是最为重要的凋亡执行者、多种凋亡刺激信号的汇聚点，被激活后促进细胞凋亡。Bax与线粒体渗透性转换孔蛋白结合促进细胞色素C从线粒体释放入细胞诱发细胞凋亡，Bcl-2则可抑制Bax移位到线粒体膜上，从而抑制凋亡。可见Bcl-2、Bax和caspase 3均为参与细胞凋亡的重要分子[21-23]。实验结果显示Fasudil抑制Rho激酶诱导自噬发生的同时，caspase 3蛋白表达降低，Bcl-2/Bax比值增高，细胞凋亡减弱；自噬抑制剂渥曼青霉干预后，自噬降低的同时caspase 3蛋白表达增加，Bcl-2/Bax比值降低，细胞凋亡增加，提示抑制Rho激酶后诱导自噬的发生，可减轻细胞凋亡。

综上所述，离体大鼠心肌I/R损伤模型中，在Fasudil抑制Rho激酶对抗心肌损伤而保护心肌中可能诱导了自噬的发生，自噬的发生影响了细胞凋亡，使凋亡降低。但是抑制Rho激酶通过何种途径诱导自噬的发生，以及自噬和凋亡相互作用的具体机制还需阐明，这也是我们下一步的研究工作。

参考文献：

[1] Zhang J, Liu XB, Cheng C, et al. Rho-kinase inhibition is involved in the activation of PI3-kinase/Akt during ischemic-preconditioning-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(11): 4107-14.

[2] Kiss A, Tratsiakovich Y, Gonon AT, et al. The role of arginase and rho kinase in cardioprotection from remote ischemic preconditioning in non-diabetic and diabetic rat *in vivo*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): 0104731.

[3] Li L, Xu J, He L, et al. The role of autophagy in cardiac hypertrophy[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016, 48(6): 491-500.

[4] Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Autophagy in disease[J]. Methods Mol Biol, 2010, 648: 79-92.

[5] Jiang H, Xiao J, Kang B. et al. PI3K/SGK1/GSK3β signaling pathway is involved in inhibition of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation by Hydrogen sulfide[J]. Exp Cell Res, 2016, 345(2): 134-40.

[6] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13807-12.

[7] Araki M, Motojima K. Hydrophobic statins induce autophagy in cultured human rhabdomyosarcoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2): 462-7.

[8] Bessho M, Aki T, Funakoshi T, et al. Rho-Kinase inhibitor Y-27632 attenuates Arsenic trioxide toxicity in H9c2 cardiomyoblastoma cells[J]. Cardiovasc Toxicol, 2013, 13(3): 267-77.

[9] Kang PF, Wu WJ, Tang Y, et al. Activation of ALDH2 with Low Concentration of Ethanol Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetes Rat Model[J]. Oxid Med Cell Longev. 2016, 2016: 6190504.

[10] Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, et al. Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia/reperfusion injury in canine coronary microcirculation *in vivo*[J]. J

ChinaXiv合作期刊

Am Coll Cardiol, 2005, 45(4): 599-607.
[11] Hamid SA, Bower HS, Baxter GF. Rho kinase activation plays a major role as a mediator of irreversible injury in reperfused myocardium[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H2598-606.
[12] 叶红伟, 康品方, 王洪巨, 等. 乙醛脱氢酶2在法舒地尔心肌保护作用中的机制探讨[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(5): 1070-2.
[13] 董淑英, 童旭辉, 刘 浩, 等. 石榴多酚对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心功能的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(7): 924-7.
[14] 赵 亮, 李 芝, 钱令波, 等. 海州香薷总黄酮对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(2): 161-5.
[15] Chen C, Hu LX, Dong T, et al. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats[J]. Life Sci, 2013, 93(7): 265-70.
[16] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4): 571-80.
[17] Vij A, Randhawa R, Parkash J, et al. Investigating regulatory signatures of human autophagy related gene 5 (ATG5) through functional in silico analysis[J]. Meta Gene, 2016, 9: 237-48.
[18] Cao L, Fu M, Kumar S, et al. Methamphetamine potentiates HIV-1 gp120-mediated autophagy via Beclin-1 and Atg5/7 as a pro-survival response in astrocytes[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(10): e2425.
[19] Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29776-87.
[20] Wang Y, Shen J, Xiong X, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver Ischemia-Reperfusion injury via Heme oxygenase-1-Induced autophagy[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98834.
[21] 邱晓晓, 戴雍月, 宋张娟, 等. SP600125对大鼠肺缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(3): 255-8.
[22] 王洪巨, 康品方, 叶红伟, 等. 乙醛脱氢酶2在糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的抗凋亡作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(3): 345-8.
[23] Zhang WP, Zong QF, Gao Q, et al. Effects of endomorphin-1 postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and myocardial cell apoptosis in a rat model[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3992-8.

（编辑:经 媛）

chinaXiv:201712.00232v1

（上接1705页）

[23] Zhang C, Long F, Wan J, et al. MicroRNA-205 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting RUNX2[J]. Oncol Rep, 2016, 35(6): 3275-84.
[24] Guan B, Li Q, Li XH, et al. MicroRNA-205 targeted Krüppel-like factor 12 and regulated MDA-MB-468 cells apoptosis in basal-like breast carcinoma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2016, 96(26): 2070-5.
[25] Huo L, Wang Y, Gong Y, et al. MicroRNA expression profiling identifies decreased expression of miR-205 in inflammatory breast cancer[J]. Mod Pathol, 2016, 29(4): 330-46.
[26] Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(5): 773-87.
[27] Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, et al. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 7972-6.
[28] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis[J]. Am J Nephrol, 2012, 36(5): 412-8.
[29] Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3): 522-9.
[30] Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(8): F1220-7.

（编辑:吴锦雅）